

## АНОТАЦІЯ

Тарабара У. К. **Спектроскопічне та молекулярно-динамічне дослідження фібрилярних агрегатів білків.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 105 – Прикладна фізика та наноматеріали (Галузь знань 10 – Природничі науки). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена вирішенню однієї з важливих проблем сучасної фізики біополімерів, пов'язаної із встановленням молекулярних механізмів структурного переходу білків із нативної конформації в агрегований фібрилярний стан. Мета роботи полягала у з'ясуванні закономірностей взаємодії нових флуорохромів з фібрилярними агрегатами білків та визначенні молекулярних детермінантів процесу фібрилізації. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Дослідити фотофізичні властивості та агрегаційну поведінку новосинтезованих гептаметинових та триметинових ціанінових барвників у розчині та у комплексі з білками методом абсорбційної спектроскопії.
2. Розвинути модель зсуву рівноваги між різними формами барвників у присутності мономерних та фібрилізованих білків.
3. Оцінити можливість диференціації між нативним і фібрилярним станами лізоциму та інсуліну за допомогою гепта- та триметинів методом флуоресцентної спектроскопії.
4. Здійснити дизайн донорно-акцепторних систем на основі класичного амілоїдного маркера Тіофлавіну Т, бензантронових і скварайнових хромофорів для каскадного переносу енергії на молекулярному скаффолді фібрил інсуліну та виявити найбільш ефективні медіатори кФРПЕ.

5. Визначити найбільш вірогідні сайти зв'язування ціанінових, бензантронових та сквараїнових барвників з амілоїдними фібрилами лізоциму та інсуліну методом молекулярного докінгу.
6. З використанням методу молекулярної динаміки виявити мутації, які сприяють переходу лізоциму та інсуліну в агрегаційно-компетентну конформацію.

Об'єкт досліджень – мономерні і фібрилізовані білки та їх комплекси з ціановими, бензантроновими та сквараїновими барвниками.

Предмет досліджень – зміни спектральних параметрів флуорохромів при їх взаємодії з амілоїдними фібрилами та агрегаційно-компетентні конформації білків.

Методи дослідження: абсорбційна спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, Фьорстерівський резонансний перенос енергії, флуоресцентна та електронна мікроскопія, методи комп'ютерного моделювання, молекулярного докінгу та молекулярної динаміки, квантово-хімічні розрахунки. При обробці експериментальних даних застосовували чисельні методи, нелінійний регресійний аналіз та методи математичної статистики.

Проведено дослідження взаємодії нових гептаметинових (AK7-5 та AK7-6) та триметинових (AK3-1, AK3-3, AK3-5, AK3-7, AK3-8, AK3-11) ціанінових барвників з мономерною і фібрилярною формами лізоциму та інсуліну. Виявлені закономірності впливу різних форм білків на агрегаційну поведінку ціанінів у водній фазі. Було продемонстровано, що всі досліджувані барвники здатні розрізняти нативний та фібрилярний стани білкових молекул. Встановлено, що нативний лізоцим сприяє руйнуванню Н-агрегатів гептаметинів у розчині та утворенню модифікованих, здатних до флуоресценції асоціатів на поверхні білка, в той час як триметинові барвники, як правило, агрегували у присутності нефібрилізованого інсуліну, утворюючи нефлуоресцентні Н-агрегати. Зв'язування гептаметинових барвників з фібрилярним лізоцимом супроводжувалось зростанням поглинання мономерної смуги та зменшенням смуги Н-агрегатів. Було

запропоновано модель білок-індукованого зсуву рівноваги між мономерами, Н-димерами та Н-агрегатами гептаметинів при комплексоутворенні мономерів та димерів АК7-5 та АК7-6 з амілоїдними фібрилами, визначені термодинамічні константи процесу самоасоціації барвників та порядок агрегації. Показано, що мономери та Н-димери є домінуючими формами зв'язаних з фібрилами ціанінів.

Вперше охарактеризовані зміни флуоресцентних спектральних параметрів гептаметинових і триметинових ціанінових барвників при їх взаємодії з білками. Виявлено амілоїд-специфічне зростання квантового виходу триметинів порівняно з нативним білком і буферним розчином та батохромний зсув максимуму флуоресценції, який для фібрилярного інсуліну становив 9–22 нм. На основі порівняльного аналізу спектральних властивостей триметинових ціанінових барвників показано, що наявність ОН-груп аліфатичних замісників на атомі азоту в бензотіазоловій частині хромофору (АК3-7, АК3-8) суттєво зменшує амілоїдну чутливість. Виявлено, що триметин АК3-11 має найвищу специфічність до амілоїдів завдяки перетворенню нефлуоресцентних агрегатів у водному розчині та нефібрилізованому інсуліні у високофлуоресцентну мономерну форму в присутності фібрилярного інсуліну. Завдяки здатності до диференціації між мономерним та фібрилярним станами білкових молекул, нові ціанінові барвники можна рекомендувати як доповнення до існуючих амілоїдних маркерів. Продемонстровано, що значне зниження ступеня Н-агрегації ціанінів може слугувати одним із критеріїв наявності амілоїдних фібрил.

Вперше метод каскадного Фьорстерівського резонансного переносу енергії був застосований для ідентифікації фібрилярного стану білків та виявлення відмінностей у морфології амілоїдних агрегатів. Був здійснений дизайн чотирьоххромофornoї системи, що складалась з класичного амілоїдного маркера Тіофлавіну Т у якості головного донора, першого медіатора (диметиламінохалкону чи одного із серії бензантронів), другого медіатора (сквараїнового барвника SQ4) та сквараїнового барвника SQ1 як

термінального акцептора. Виявлено, що ефективність трьохетапного переносу енергії, а також ступінь підсилення флуоресценції термінального акцептора SQ1 були набагато вищими у фібрилах інсуліну, ніж у нефібрилізованому білку. Показано, що головний донор енергії, Тіофлавін Т, у поєднанні з досліджуваними медіаторами виступають ефективними ампліфікаторами спектрального відгуку SQ1. У чотирихромофорній системі спостерігався зсув максимуму випромінювання флуоресценції на  $\sim 200$  нм (від 480 до 680 нм) в область оптичного вікна біологічних тканин, що створює передумови для підвищення точності і чутливості детектування амілоїдів внаслідок значного послаблення ефектів релеєвського і раманівського розсіювання та аутофлуоресценції біологічних зразків. Виявлені відмінності у величині ампліфікації флуоресценції кінцевого акцептора, та у значеннях ефективності переносу енергії в каскаді  $\text{ThT} \rightarrow \text{ABM} \rightarrow \text{SQ4} \rightarrow \text{SQ1}$  для інсулінових фібрил різної морфології, отриманих двома способами: а) шляхом інкубації білка за денатуруючих умов (рН 2.0, температура 65 °C); та б) за допомогою перемішування розчину білка на орбітальному ротаторі при температурі 37 °C. Ці дані вказують на можливість використання багатоетапного Фьорстерівського переносу енергії для виявлення структурних відмінностей фібрилярних агрегатів білків. При оптимізації хромофорного складу каскаду ФРПЕ встановлено, що бензантронові барвники з піперидиновим та морфоліновим циклами, а саме А6 та АВМ, є найбільш ефективними медіаторами переносу енергії. Отримані результати створюють підґрунтя для розвитку нових методів детектування та структурного аналізу амілоїдів на основі ФРПЕ, а також відкривають шлях для використання мультихромофорних ансамблів на амілоїдній матриці для розробки нанофотонних пристроїв.

Методом молекулярного докінгу показано, що, подібно до типових амілоїдних маркерів, досліджувані ціанінові, бензантронові та сквараїнові барвники характеризуються здатністю зв'язуватись зі специфічними структурними елементами фібрилярних агрегатів – поверхневими жолобками

β-листів. Продemonстровано, що жолобок Gln15–Glu17 є найбільш енергетично вигідним сайтом зв'язування для досліджуваних барвників.

Встановлено, що амілоїдогенні мутації лізоциму та інсуліну можуть призводити як до глобальної структурної дестабілізації білків, так і до локальних модифікацій конформації та динаміки окремих областей поліпептидного ланцюга. На основі аналізу змін параметрів, таких як середньоквадратичне відхилення остову ланцюга, радіус інерції, площа поверхні, що доступна для розчинника, середньоквадратичні флуктуації та вміст вторинної структури, а також застосовуючи різні критерії, що характеризують втрату як третинної так і вторинної структур білка під час теплового розгортання, було виявлено, що залежно від часової еволюції інтегральних характеристик, досліджувані амілоїдогенні мутанти лізоциму можна умовно розділити на три групи, в яких середньоквадратичне відхилення остову ланцюга, радіус інерції та площа поверхні, що доступна для розчинника, зростають швидше (Y54N та F57I/T70N), подібно (D67H та I56T) та повільніше (W64, F57I та T70N/W112R) у порівнянні з білком дикого типу.

Для більшості мутантів лізоциму виявлена вища гнучкість C- і D-спіралей порівняно з диким типом, за винятком W64R та Y54N, які призводили до помітного зменшення (W64R), або зростання (Y54N) рухливості майже всіх амінокислотних залишків. Аналіз еволюції вторинної структури показав, що α-домен лізоциму, як правило, є більш стабільним, ніж β-домен, хоча характер розгортання окремих α-спіралей залежить від мутації. Отримано докази на користь того, що мутації Y54N та F57I/T70N лізоциму та мутації Ser<sup>A13</sup>+Glu<sup>B27</sup> та Gln<sup>B18</sup> інсуліну мають найбільш дестабілізуючий вплив на структуру білків.

У сукупності, отримані результати підтверджують думку про те, що глобальна структурна дестабілізація амілоїдогенних мутантів не є єдиним детермінантом місфолдингу білків, а локальні зміни конформації та динаміки

поліпептидного ланцюга також можуть відігравати важливу роль у формуванні амілоїдних фібрил.

З практичної точки зору, досліджені у роботі нові гепта- та триметинові ціанінові барвники можуть бути застосовані при розробці мультихромофорних та мультипараметричних тест-систем для диференціації між нативним та фібрилізованим станами білкових молекул. Запропонований метод ідентифікації амілоїдних фібрил, що базується на вимірюванні ефективності каскадного переносу енергії між амілоїд-специфічними хромофорами, важливий для розробки високочутливих методів медичної діагностики амілоїдних патологій *in vivo*, причому висока точність та інформативність цих методів будуть визначатись поєднанням переваг окремих флуорохромів, серед яких, зокрема, високий квантовий вихід головного донора та значний ефективний Стоксів зсув, що дозволить проводити діагностику в області низької аутофлуоресценції біологічних тканин. Отримані дані відкривають шлях до застосування методу кФРПЕ для структурного аналізу фібрилярних білкових агрегатів. Моделі та методичні підходи, що набули у роботі подальшого вдосконалення, можуть бути використані при тестуванні амілоїдної специфічності та чутливості новосинтезованих барвників.

**Ключові слова:** абсорбційна спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, ціанінові барвники, амілоїдні фібрили, лізоцим, інсулін, Фьорстерівський резонансний перенос енергії, молекулярна динаміка.